

Open Research Online

The Open University's repository of research publications and other research outputs

UVA light-assisted anticancer drugs - study on 4-thiothymidine and its analogues

Journal Item

How to cite:

Zhang, X. H.; Wang, A. L.; Li, D. P. and Xu, Y.-Z. (2010). UVA light-assisted anticancer drugs - study on 4-thiothymidine and its analogues. *Progress in Chemistry*, 22(5) pp. 784–795.

For guidance on citations see [FAQs](#).

© 2010 Editorial Office of Progress in Chemistry

Version: Version of Record

Link(s) to article on publisher's website:

<http://www.progchem.ac.cn/CN/abstract/abstract10336.shtml>

Copyright and Moral Rights for the articles on this site are retained by the individual authors and/or other copyright owners. For more information on Open Research Online's data [policy](#) on reuse of materials please consult the policies page.

oro.open.ac.uk

4-硫脱氧胸苷及类似物在 UVA 光辅助治疗 抗癌药物方面的研究

张晓辉^{1*} 王爱玲¹ 李德鹏¹ 徐耀忠²

(1. 大连大学环境与化学工程学院 大连 116622; 2. Department of Chemistry and Analytical Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes MK7 6AA, UK)

摘 要 本文叙述了含硫碱基 DNA 的化学和医疗应用。硫碱基(thio-base)有其独特的性质,比如,易烷基化,易氧化和强的紫外长波(315—400nm, UVA)吸收。这些特定化学和物理性质存于含硫碱基、含硫核苷和含硫碱基的 DNA 中,它们对制备修饰的 DNA 和含硫碱基的 DNA 与其他生物大分子之间进行光诱导的交联反应非常有用。功能化的含有硫碱基的 DNA 及其类似物可用于 DNA 的修复研究。本文介绍和评述了利用紫外光/含硫胸腺嘧啶脱氧核苷(UVA/thiothymidine)的抗癌疗法,同时,探讨了含硫核苷类似物和紫外光之间的协同作用,为癌症和其他疾病治疗提供一种新的方法。

关键词 4-硫脱氧胸苷 改性碱基 DNA 修复 抗癌药物 光动力疗法(PDT)

中图分类号: O629.74; O625.7; Q914.4 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2010)05-0784-12

UVA Light-Assisted Anticancer Drugs—— Study on 4-Thiothymidine & Its Analogues

Zhang Xiaohui^{1*} Wang Ailing¹ Li Depeng¹ Xu Yaozhong²

(1. College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622, China;

2. Department of Chemistry and Analytical Sciences, The Open University, Walton Hall, Milton Keynes MK7 6AA, UK)

Abstract The article reviews the chemical methods for the preparation of DNA containing 4-thiothymine. 4-Thiothymine has several unique properties, such as easy alkylation, ready oxidation and strong absorption in UVA region. These chemical and physical properties are retained at its nucleoside and DNA levels and particularly useful for chemical manipulation and photo crossing of the thiothymine DNA with other biomolecules of interest. The ability to make DNA containing thiothymine or their functionalized analogues is also useful for studying DNA repairs. UVA/thiothymidine anti-cancer therapy is also introduced and discussed. The synergetic exploration of sulfur-containing nucleoside analogues and ultraviolet light could provide a new way for treatment of cancer.

Key words thiothymidine; modified bases; DNA repair; anticancer drugs; photodynamic therapy (PDT)

Contents

- 1 Introduction
- 2 An overview of photodynamic therapy (PDT)
- 3 Thiothymidine & analogues as potential UVA light-

assisted anticancer drugs

- 4 Chemical synthesis of base-modified DNA
 - 4.1 Conventional synthetic approach
 - 4.2 Post-synthetic functionalization
 - 4.3 Combined approach

收稿: 2009 年 10 月, 收修改稿: 2009 年 12 月(特约)

* Corresponding author e-mail: xiaohui99@hotmail.co.uk

- 5 Synthetic chemistry of DNA containing 4-thiothymine
 - 5.1 Preparation of 4-thiothymidine
 - 5.2 Preparation of phosphoramidite of 4-thiothymidine and its incorporation in DNA synthesis
 - 5.3 Purification
 - 5.4 Composition analysis
- 6 Chemical and physical properties of thiothymine in DNA
 - 6.1 Direct alkylation
 - 6.2 Photochemistry
 - 6.3 UV absorption and application of 4-thiothymidine
- 7 DNA containing 4-thiothymine used for cancer studies
 - 7.1 The role of ultraviolet light-induced activation as a novel cancer therapy
 - 7.2 Exploration of 4-thiothymidine & analogues (5-Br-4-thiodU) as potential prodrugs
- 8 Conclusion and outlook

1 引言

众所周知,癌症已成为目前人类最主要的死因之一。癌症产生的主要原因是DNA损伤。一般来说,DNA频繁地受细胞内部和外部物质的破坏^[1],细胞中受损的DNA在一段时间内可被修复变为正常细胞,但在某些情况下受损的DNA在一段时间内不能被修复,由此会产生癌症或导致细胞死亡^[2]。目前治疗恶性肿瘤的方法主要有放疗、化疗和手术治疗等。手术治疗往往是在癌症的晚期,成功率不高,最常采用的是化疗和放疗。化疗是以药物为主要的治疗手段,因此寻找选择性高的抗癌药物是当前医药界的重要研究课题。

化疗又叫化学治疗,是一种通过改变DNA从而完全杀死癌细胞的系统方法,是治疗癌症的重要手段之一。但目前应用的化疗药物具有较大毒性,以致于杀死癌细胞的同时也杀伤了正常的组织细胞。因此,寻找靶位精确且不伤害或少伤害正常细胞的抗癌药物已成为一项重要的前沿课题。放疗也叫辐射治疗,是用电离辐射对癌症和其他疾病进行治疗。电离辐射通过聚集能量进而破坏DNA,达到破坏靶组织的目的,一般采用高能X射线和γ射线。放疗能够将射线精确地聚焦在靶组织上,然而高能射线在杀死癌细胞的同时也会伤害正常细胞。很明显,

放疗和化疗方法对病人都具有严重的副作用,因此迫切需要一种更好的癌症治疗方法,也就是综合以上两种治疗方法的优点即化疗中系统传递(能使药物到达全身癌细胞)和放疗中靶位辐射(射线专一性地作用于局部组织)。这样的治疗方法有现在流行的光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)和正在研发的紫外光(UVA)辅助抗癌药物治疗方法。

本文结合本研究小组近年来在含硫胸腺嘧啶核苷作为紫外光(UVA)辅助作用下抗癌药物研究领域中的工作,重点介绍和评述了光动力疗法(PDT)、紫外光/含硫胸腺嘧啶脱氧核苷(UVA/thiothymidine)抗癌疗法、4-含硫脱氧胸(腺嘧啶脱氧核)苷DNA合成化学及化学和物理性质以及其在生物学研究中的应用等方面的研究进展,并对在紫外光(UVA)辅助下含硫脱氧胸苷的DNA作为抗癌药物的新型技术等研究成果做出展望。为进一步癌症治疗研究提供了方向和思路,期待更多的生物和化学工作者介入本领域的研究中来。

2 光动力疗法(PDT)概述

癌症治疗中具有挑战性的任务就是选择性地靶向杀死癌细胞,同时,减小对正常细胞的破坏。光学治疗是目前临床采用的治疗方法之一,现有光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)^[3]:主要是基于“光敏药物”对肿瘤细胞和对正常组织细胞具有不同的亲合性,利用光敏剂选择性地实现在肿瘤组织中的光生化反应,达到杀死肿瘤细胞的目的。其主要过程如下:

单态吸收: $^1S + h\nu \rightarrow ^1S^*$

系统间交叉衰变: $^1S^* \rightarrow ^3S^*$

分子内部交换: $^3S^* + ^3O_2 \rightarrow ^1S + ^1O_2^*$

细胞氧化: $^1O_2^* + \text{细胞} \rightarrow \text{Ox}$

其基本原理是:光敏剂在各组织中的半衰期不同,经一段时间后,光敏剂浓度在成肿瘤组织中高于其周围正常组织。在特定波长光的照射下产生共振激发,基态光敏剂(S)吸收光子后,由短暂存在的单线态(1S)转变成激发三线态(3S),三线态光敏剂一方面作用于组织底物或氢原子或电子,其产物再与三线态氧分子(3O_2)作用形成各种氧化物(Ox);另一方面它可直接将能量转移给氧,形成单线态氧(1O_2)。单线态氧和氧化物都具有细胞毒作用,激发的单线态氧是高活性的,与生物分子中的氧化敏感基团作用导致其氧化功能失活,最终引起细胞死亡,它是光动力疗法中诱导肿瘤坏死的主要形式之

一。单线态氧的寿命很短且可移动距离有限,所以光学治疗中受损细胞和组织的位置与光敏剂所在位置及光的分布有密切关系。光敏试剂需要特定波长的光使其激活,该光波长一般在可见光范围内(630—760nm),通过光纤将其传送到肿瘤部位。临床使用的光敏试剂有卟非姆钠(porphimer sodium, photofrin),卟啉苯衍生物的单一酸环(benzoporphyrin derivative monoacid ring A, BPD-MA),维替泊芬(verteporfin)和5-氨基酮戊酸(5-aminolevulinic acid, ALA)等,分别代表一大类光敏试剂,新型光敏试剂正在研究中^[4]。由于目前使用的光敏试剂不能专一地聚集在细胞核,所以光学治疗未能选择性地破坏DNA,也不具备选择性地杀死癌细胞的特征。

肿瘤光动力疗法(PDT)自问世20年来,不仅基础研究有了长足进步,临床研究也积累了丰富资料。20世纪90年代初,加、荷、美、日等国已经先后将光动力疗法确认为一种新的肿瘤疗法。这就对药物化学家提出了一项新的课题:研究、开发和提供肿瘤光动力治疗新药,这种新药必须具有结构明确、理化性质稳定、肿瘤选择性摄入率高、光谱学理想、光动力作用强和细胞毒性低的特性^[5]。可以预期,光动力疗法由于其独特的优点和良好的兼容性,必将成为肿瘤诊断和治疗中的新秀,在肿瘤的综合治疗中发挥重要作用。

3 4-硫脱氧胸苷作为 UVA 光辅助抗癌药物

在以往大量的抗病毒和抗癌活性测试研究中,研究者主要对5-取代-2'-脱氧尿苷及其类似物进行了研究^[6,7],而对4-硫代-5-取代-2'-脱氧尿苷及其类似物的合成^[8-11]和生物学探索^[12]甚少。自从Lipsett^[13]从大肠杆菌分离出4-thiouridylic酸以来,含硫及硫代类似物的DNA组成部分(如硫碱基(thio-base)和硫代核苷(thio-nucleoside))吸引了人们的广泛关注。DNA是主要的遗传物质,天然产生的DNA不同于蛋白质,它不含有硫。相对于正常的DNA组成,含硫代类似物的DNA拥有独特的生物、化学和物理性质^[14-19]。尤其是含硫碱基对紫外线的高灵敏度,使我们能够选择性地对含硫代类似物的DNA进行跟踪,同时,尽量减小对正常DNA的影响。导致这些性质的主要原因在于碱基(A, G, C, T)是最主要的DNA的发色基团,其吸收光谱分布在紫外区域(260—270nm),含硫类似物则在紫外长波(315—400nm, UVA)区有吸收,这为癌症和其

他疾病的治疗提供了一种新的途径^[20-23]。

徐耀忠和Karran等^[22,24]近来研究发现4-硫胸腺嘧啶脱氧核苷[2'-deoxy-4-thiothymidine, S⁴-dT]与UVA光作用能够选择地破坏DNA,并杀死癌细胞。这种杀伤力来自于4-硫脱氧胸苷与紫外光(UVA)的协同作用。4-硫脱氧胸苷在结构上与脱氧胸苷很相似,可进入DNA内;并像脱氧胸苷一样,可专一性地与腺嘌呤核苷配对,因此单独的4-硫脱氧胸苷对细胞不具有毒性。但是经4-硫脱氧胸苷培养过的细胞对低强度的UVA光非常敏感,这是因为4-硫脱氧胸苷在335nm处有最大吸收(图1),对紫外光(UVA)高度敏感。4-硫脱氧胸苷与紫外光(UVA)协同作用于DNA时,还与胸苷激酶(thymidine kinase, TK)的含量有关。提高TK含量,对正在生长的细胞(如癌细胞)中DNA的复制影响更大。因此研究和开发4-硫脱氧胸苷及类似物,作为UVA光辅助抗癌药物,用于癌症治疗是很有意义的。

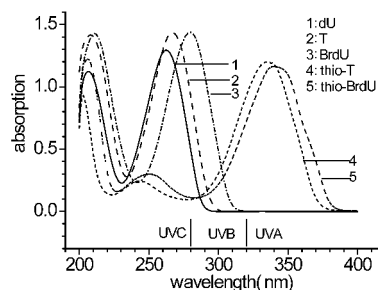


图1 dT和S⁴-dT, BrdU和S⁴-BrdU的化学结构式及其UV光谱^[25,43]

Fig. 1 UV spectra and chemical structures of thymidine (dT) and 4-thiothymidine (S⁴-dT), 5-bromodeoxyuridine (BrdU) and 4-thio-5-bromodeoxyuridine (S⁴-BrdU)^[25,43]

并非所有含硫脱氧胸苷都可以作为UVA光辅助抗癌药物,并对UVA具有较好的吸收。例如,硫代脱氧胸苷中4-硫羰基比2-硫羰基有更好的紫外吸收。其原因主要有两个:一是4-thioT紫外线吸收波长比2-thioT要长得多,2'-脱氧胸苷(dT)的UV λ_{\max} (C₂H₅OH) = 270nm, 2-硫代-2'-脱氧胸苷(S²-dT)的UV λ_{\max} (pH = 6) = 276 nm, 而4-硫-2'-脱氧胸苷(S⁴-dT)的UV λ_{\max} (pH = 7) = 335nm^[25](图2)。后者可以方便地吸收近紫外线(UVA)。二是

胸腺嘧啶碱基在2位和4位分别有羰基或硫羰基(thiocarbonyl)。实验发现,在4-硫脱氧胸苷碱基中4-硫羰基的反应活性远高于2-硫羰基的反应活性^[26],所以在寡核苷酸或DNA中4-硫-胸腺嘧啶很容易吸收近紫外光(UVA)并与DNA发生光反应,从而损害DNA及其细胞。为此4-硫脱氧胸苷可作为紫外光(UVA)辅助治疗癌症中的抗癌药物,即UVA/thiothymidine疗法。

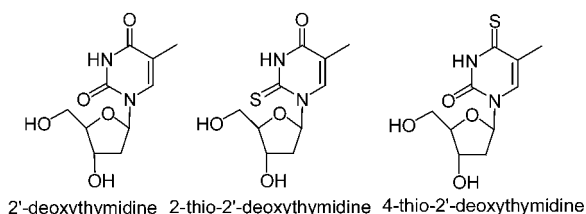


图2 dT, S²-dT 和 S⁴-dT 的化学结构式^[25]

Fig. 2 Chemical structures of dT, S²-dT and S⁴-dT^[25]

UVA/thiothymidine 疗法是利用UVA光和4-硫脱氧胸(腺嘧啶脱氧核)苷(4-thiothymidine)的协同作用来损伤DNA及其细胞。癌症组织细胞,由于其快速增长,癌细胞需更多地复制DNA,因此更容易富集4-硫胸腺嘧啶(碱基),比正常组织细胞更容易受到紫外线的影响。研究表明,当含有4-硫胸腺嘧啶(碱基)的细胞暴露在紫外光时,对正常组织细胞无害的低剂量紫外光很容易把含有4-硫胸腺嘧啶(即带此碱基的DNA)的癌细胞杀死^[25]。因此,4-硫脱氧胸苷结合紫外光疗法,在治疗癌症方面具有良好的潜力,特别是对皮肤癌和其他一些易受光影响的肿瘤^[24]。在治疗癌症方面,与传统的化疗和放疗相比,这种疗法是一种较温和且具有高选择性的方法。如化疗一样,此疗法将使药物(4-硫脱氧胸苷)在人体内循环,因此具有破坏身体不同部位的癌细胞的潜能。与化疗不同的是,这种药物很少进入正常细胞,故在接触到紫外光时,也很少或不损害正常组织细胞,因此这种药物毒性较低。另外,还结合放射治疗的特点,可以把紫外光集中到指定区域,提高专一性。与放射治疗不同的是,紫外光的能量要低得多,并且它只杀死含有对紫外线辐射光敏感碱基的细胞。这种方法将更加适用于皮肤癌及其他存在于皮肤表面的肿瘤细胞,因为这些细胞容易获得紫外线光源。当然,它也可以借助光纤设备解决某些内部癌症的细胞或组织,这将使这种方法成为更有效的癌症治疗方法。

光动力疗法(PDT)和UVA/thiothymidine 疗法

相同之处在于都使用光辐射(可见光、近红外光或紫外光)在“光敏药物”的协助下杀死癌细胞;不同之处是,光动力疗法在光敏化剂存在下,光能被光敏化剂分子吸收,它如同催化剂那样不断反复地光敏化,产生光氧化作用,它们与生物分子中的氧化敏感基团作用导致其氧化失活,最终引起细胞死亡而发挥治疗作用。UVA/thiothymidine 疗法是4-硫脱氧胸苷进入癌细胞的DNA,当细胞暴露在低剂量紫外光时,对正常组织细胞无害的紫外光线(UVA)很容易把含有4-硫胸腺嘧啶(碱基)的DNA的癌细胞杀死。

对于光动力疗法,生物体系中的变化是光敏剂引发的光氧化过程的结果,由于目前用的光敏化剂不能专一地聚集在细胞核,所以光动力疗法不能选择性破坏DNA。另外,光动力疗法不具有选择性地分辨和杀死癌细胞的特征。为解决这一问题,Karran和徐耀忠提出上述UVA/thiothymidine 疗法,即紫外光(UVA)辅助治疗下的4-硫脱氧胸苷类抗癌药物疗法,以解决当前癌症治疗中的不足。

4-硫脱氧胸苷是一种碱基修饰的核苷。为了更好地理解其生物学和药理学性能,有必要讨论其相关的化学。

4 碱基修饰DNA的化学合成

4.1 常规合成方法

这种合成方法常用于制备无需修饰的DNA^[27]。目前,此法已经广泛地应用于含有修饰碱基的DNA的制备中^[28,29]。其步骤如下:(1)制备所需的碱基修饰过的核苷;(2)使其转变成碱基修饰过的核苷亚磷酸酰胺;(3)通过自动化的DNA合成器,结合亚磷酸酰胺合成法合成低聚物(oligomer)。合成好的碱基修饰过的低聚物还需进行合成后处理(post-synthesis),比如,去保护和提纯,最后产生需要的碱基修饰的DNA。

4.2 合成后再功能化

以上是制备含有稳定的修饰碱基DNA的常规方法,修饰碱基必须遵循在DNA合成中和合成后的各种反应。但在DNA制备之后的分离提纯过程中,有些具有生物特性的修饰碱基不是很稳定。为了解决这个问题,引进了合成后置换法(post-synthetic substitution)^[30-33]或用酶催化转换核苷的方法^[34,35]。其要点是:找一个带有合适离去基团的聚合体,并且这个离去基团在DNA的合成和转换中是稳定的,在合成后可通过其他的化学药品对这个碱

基上进行所需官能团的转换。

4.3 组合方法

化学合成是合成较短或适中长度低聚体(一般不会超过 30 个碱基)的理想方法。随着链的增长, DNA 合成反应会生成新的、较多量的副产物,导致产品纯化较困难。用化学方法制备含有修饰碱基的较长的低聚体是更加困难的。新的策略(化学合成和酶捆绑)是解决这一难题的好方法。原理是:首先用常规的或合成后再功能化的方法来制备含有修饰碱基的低聚体,然后用 DNA 激酶和 ATP 在被修饰的低聚体的 5'位磷酸化后,再与另外一个低聚体通过 DNA 连接酶形成更长的 DNA 片段^[36, 37]。

尽管生命体中只有 4 个碱基成分(腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶和胸腺嘧啶(一些特殊情况下 5-甲基胞嘧啶))用于 DNA 中,并用它们来保存和传递遗传信息,但 DNA 损伤而生成的修饰碱基的数量将远远多于 4 个,至少已有 33 种不同形式的受损碱基作为 DNA 糖基化酶的底物,其修复机理已得到很好的研究^[34]。研究碱基修饰 DNA 的领域在不断发展,已有众多关于碱基修饰 DNA 的制备且应用于生物研究的报道^[28, 29, 36, 37]。碱基修饰 DNA 最初的化学研究是将碱基修饰的 DNA 作为 DNA 修复研究的底物,现在化学研究已被用于其他领域。例如,在特定的 DNA 基团上引进一个核磁共振(NMR)敏感原子,用于核磁分析 DNA 结构或它与蛋白质的相互作用^[38, 39]。本文不能收集所有碱基修饰 DNA 的化学反应,这里集中介绍含有硫碱基(硫胸腺嘧啶) DNA 的化学合成和近期在癌症研究中的应用。

5 含 4-硫脱氧胸苷的 DNA 合成化学

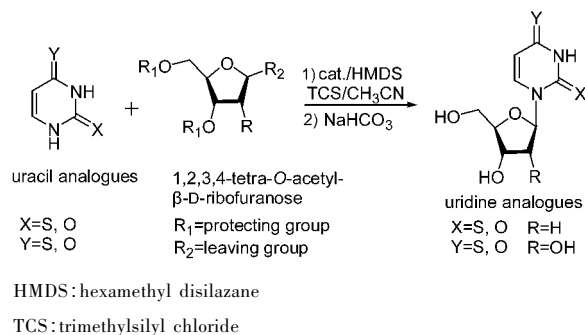
从化学结构上看,核苷类化合物的共同特点是由糖基和碱基构成。修饰核苷和天然核苷存在着不同程度的相似之处,所以在体内有以假乱真之效。核苷类化合物可以从两方面进行修饰:糖基的修饰和碱基的修饰。这两种修饰都可以不同程度地改变核苷化合物的生物活性。胸(腺嘧啶脱氧核)苷是由糖和胸腺嘧啶组成的化学物质,而含硫胸(腺嘧啶脱氧核)苷也是糖和含硫胸腺嘧啶组成的化学物质。

4-硫脱氧胸苷(S^4 -TdR)是一种天然的脱氧胸苷(TdR)的类似物,其中的 4 位氧原子被硫原子取代,它具有很强的紫外线(UVA)吸收^[30-33](见图 2, TdR 和 S^4 -TdR)。2001 年, Massey 等^[22, 24]提出 4-硫脱氧胸苷(S^4 -TdR)在紫外线作用下是潜在的治疗癌症药物。他们发现 4-硫脱氧胸苷可以很容易地进

入细胞的 DNA,低剂量的紫外线对含有 4-硫脱氧胸苷的 DNA 很容易造成致命伤害。这个 DNA 的致命性损伤可能是 4-硫脱氧胸苷在紫外线作用下导致细胞死亡的机制之一,关于详细机制解释还未见报道。因此,对 4-硫脱氧胸苷的光物理和光化学研究有助于理解 4-硫脱氧胸苷如何在紫外线作用下诱导细胞死亡的作用机制。

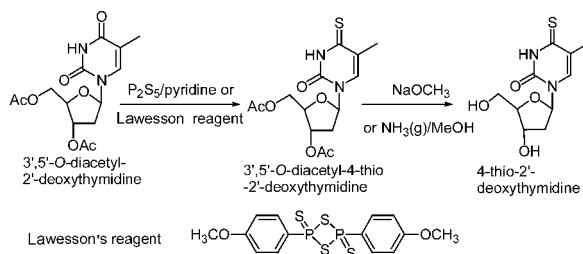
5.1 4-硫脱氧胸苷的制备

制备含有硫碱基 DNA 常规方法的第一步就是获得必需的含硫核苷(如保护好的含硫碱基核苷)。虽然一些含硫碱基(如 4-硫尿嘧啶, 4-thiouracil)的核苷可以买到,但大多数含硫碱基脱氧核糖核苷还未商品化。本文中含硫核苷指的是带有硫碱基的脱氧核糖核苷。方法之一是使含硫碱基和脱氧核糖结合在一起(图式 1)^[40]。另一种广泛使用的方法是修饰相应的核苷。4-硫脱氧胸苷和 4-硫脱氧尿苷可以通过用糖基被保护的嘧啶核苷与 P_2S_5 或者 Lawesson's 试剂^[41]来制备(图式 2)。



图式 1 从尿嘧啶类似物和糖合成尿苷类似物^[40]

Scheme 1 Synthesis of uridine analogues from uracil analogues and sugar^[40]

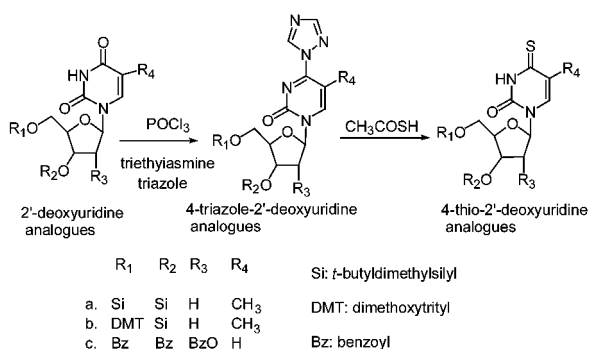


图式 2 五硫化二磷/吡啶或 Lawesson's 试剂法合成 4-硫-2'-脱氧胸腺嘧啶核苷^[41]

Scheme 2 Synthesis of 4-thio-2'-deoxythymidine by use of P_2S_5 /pyridine or Lawesson reagent^[41]

图式 2 路线只适用于对酸稳定和对温度不敏感的核苷合成。但是有些 4-硫脱氧胸苷的类似物,如 4-硫-5-溴-2'-脱氧尿苷(4-thio-5-bromo-2'-deoxyuri-

dine) 和 4-硫-5-碘-2'-脱氧尿苷 (4-thio-5-iodo-2'-deoxyuridine) 的合成受温度影响较大,因此,有必要设计一条新的合成方案^[42]。方法之一是把嘧啶核苷 4 位上氧转变成三唑,此反应产率几乎定量。接着,合成的混合物只需用硫代乙酸处理,即可获得所需要的硫代核苷(图式 3)。由于硫的存在,硫代核苷在紫外线(326—335nm)下有很强的吸收。这个反应的主要优点是合成中所有反应都在室温下进行,也同样适用于其他对温度敏感的化合物以及携带在 5'位上有保护基团(DMT)的核苷。4-硫脱氧胸苷的类似物(4-硫-5-溴-2'-脱氧尿苷^[43]和 4-硫-5-碘-2'-脱氧尿苷^[44])也可以用同样的方法来合成。



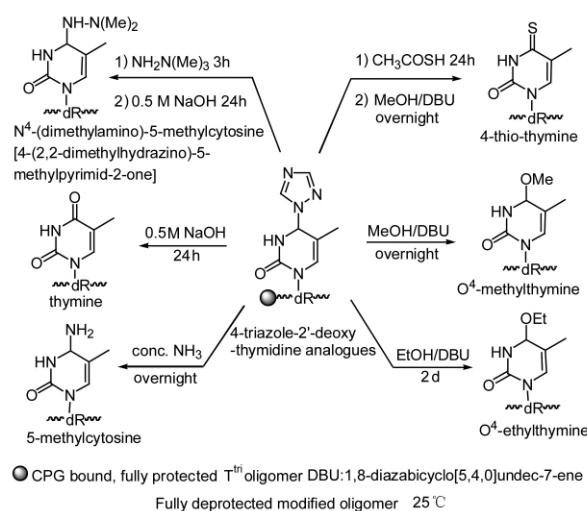
图式 3 三唑法合成 4-硫-2'-脱氧胸腺嘧啶核苷及类似物^[42]

Scheme 3 Synthesis of 4-thio-2'-deoxythymidine analogues via triazolo substituent^[42]

5.2 4-硫脱氧胸苷衍生物的制备及其纳入 DNA 中的方法

含硫碱基的脱氧核苷可以方便地转换成它们的亚磷酸酯单体。如何将带有含硫碱基单体和 4 个自然碱基单体纳入 DNA 中是值得研究的。在早期的研究中^[45,46],制备 4-三唑胸腺嘧啶核苷亚磷酸酯单体的产率可达到 97%,并且这种 4-三唑胸腺嘧啶核苷能够稳定地进入到 DNA 低聚物中。在 25℃,用不同的试剂与连接到多孔玻璃支持的载体(controlled-pore-glass, CPG)上的保护的底聚物反应,可取代底聚物中 4 位的三唑基团,进而合成所需要的转基团底聚物(图式 4)^[45]。

通过更深入的研究发现,对硝基苯硫基是一个保护基,而且是一个容易被快速亲核取代的、好的离去基团,因为它在 DNA 合成中是稳定的,能用来合成各种修饰的 DNA。图式 5 提供了一个普遍的方法(合成后再功能化途径),在 DNA 合成中,通过这种方法很容易制备各种 4-取代硫嘧啶衍生物而不用反复制备每一个修饰碱基核苷亚磷酸酯的单



图式 4 含硫胸腺嘧啶寡核苷酸产品的合成^[45]

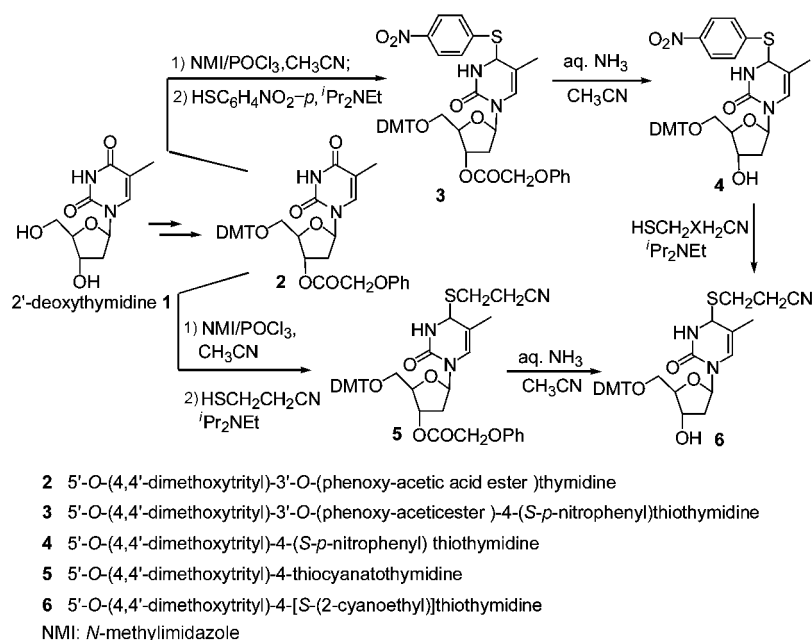
Scheme 4 Synthesis of oligomers containing thymine analogues^[45]

体^[47]。由于 4-硫胸腺嘧啶中硫原子具有极强的亲核性,它可与各类试剂(如甲基碘)直接反应,即实现硫酮的功能化。

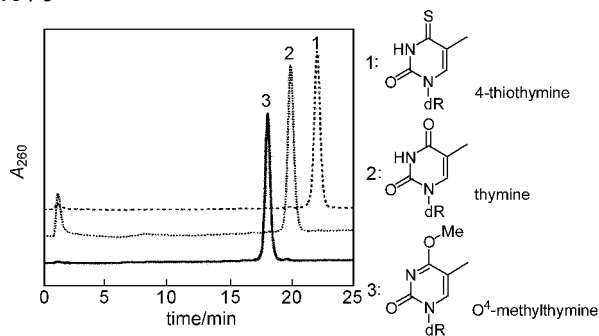
我们制备了包含有 4-硫胸腺嘧啶(碱基)衍生物的 DNA。由于 4-三唑嘧啶衍生物(碱基)很容易制备^[50]并且容易被氮丙啶^[51]和硫羟乙酸所取代^[46],因此合成后再功能化的方法已被用在制备含 4-硫胸腺嘧啶(碱基)的 DNA 和其他 4 位取代胸腺嘧啶(碱基)衍生物^[45]的合成中(此方法在图式 4 中提到)。此法也应用于很多其他工作中并用于 RNA 模拟物的制备中^[52]。其它制备含有 4-硫嘧啶(碱基)DNA 的方法已有报道^[53—55]。

5.3 纯化

以上我们介绍了几种制备修饰碱基 DNA 的方法^[48],在制备了相关碱基 DNA 后,下一步工作是如何纯化,从而最终获得生物研究所需要的 DNA。在很多分子生物学的实验中,需要高纯度含有碱基修饰的 DNA,所以制备高纯度改性修饰 DNA 的低聚体是非常重要的。提纯一个低聚体最常用的方法是高压液相色谱法(HPLC)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。HPLC 有两种类型:反相法和阴离子交换法。一个中等长度(如 15 聚体)的低聚体,具有很相近的化学性质,用反相 HPLC 法分离效果不佳。虽然阴离子交换 HPLC 法在中性条件下有时可分开长度相差仅一个核苷的低聚体,然而多数情况下不能分离长度相等的低聚体。PAGE 法也可在中性条件下进行,但也不能分离长度相等而只有一个基团不同的低聚体。

图式 5 5'-氧(4,4'-二甲氧基)-4-[S-(2-氰乙基)]硫胸腺嘧啶产物的合成和结构^[45-47, 50, 51]Scheme 5 Synthesis of 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4-[S-(2-cyanoethyl)]thiothymidine^[45-47, 50, 51]

为了突破这个限制,我们设计了新的方案^[56],用阴离子交换柱在 pH = 12 的碱液中将包含有修饰的胸腺嘧啶(图 3)和修饰的鸟嘌呤(或嘌呤)的低聚体进行分离、提纯。并在 pH > 10 的溶液中进行分离,这一过程可通过以下原理解释:pH > 10 时,不仅磷酸盐质子被解离,而且连在碱基上的亚胺基的质子也被解离,因此具有胸腺嘧啶的低聚体比具有 O⁴-甲基胸腺嘧啶(图 3)的低聚体多一个电荷。这个机理也可以解释含有其他的 O⁴-修饰胸腺嘧啶或者 O⁶-修饰鸟嘌呤的低聚体从它们各自母体中的分离。

图 3 液相色谱上的阴离子交换柱 (pH = 12) 21 聚体 (GCA CCT CCT TGX TGA CCT GCT) 的色谱图^[56]Fig. 3 Liquid chromatograms on an anion exchange column at pH = 12 of synthetic 21-mers with the sequence GCA CCT CCT TGX TGA CCT GCT (peak 1: X, 4-thiothymine; peak 2: X, thymine; peak 3: PX, O⁴-methylthymine)^[56]

将含硫碱基的低聚体从其烷基化的含硫碱基低聚体分离出来是具有实际意义的。此外,尽管含硫碱基(如含硫胸腺嘧啶)和它的母体碱基(如氧的类似物,胸腺嘧啶)在 4 位上都含有亚胺基的质子,然而我们发现,在洗提过程中,含硫碱基低聚体迟于它的母体低聚体出峰(图 3)。这个分离方案提供了一种有效的方法来提纯修饰碱基低聚体,但是有些含修饰碱基(如 O⁴-烷基胸腺嘧啶)低聚体在碱性溶液中不是很稳定,这一点需要特别注意。尽管如此,这个方法仍然可以使用。只要确保产物峰被收集后,将溶液立即调成中性。

5.4 组成分析

为确定已制备并被纯化的低聚体就是所需的修饰低聚体,还必须确定这种低聚体具有正确的长度和碱基成分。一个低聚体的长度可以用 PAGE 分析法轻易地检测。对修饰碱基的低聚体来说,确定碱基组成是尤其重要的。通常应用的方法有碱基成分分析和核苷成分分析。前者通常是用加热的酸性水解溶液将碱基从糖中切下,然后用阴离子交换法(或纸色谱法)分析得到的碱基。这种方法不适用于对酸或温度敏感的修饰碱基。核苷成分分析是将低聚体酶解成核苷,然后用 HPLC 反相法分析核苷。因为酶解生成核苷的条件温和,HPLC 可以很好地将修饰碱基核苷从其他核苷中分离出来,这种方法在文献中经常被提到。

以下是一个典型的例子:用磷酸二酯酶分解已纯化的低聚体(约 0.5OD),然后用碱性磷酸酯酶来酶解生成核苷。经 HPLC 反相法分离核苷(天然和改性核苷),再用紫外线探测器检测出未修饰碱基核苷在 260nm 处有吸收峰,而含硫核苷在 310—340nm 处有吸收峰。应该强调的是,所有制备、提纯和分析的条件都是温和的,这样可以保证改性核苷在分析前后均保持完整。

6 含有 4-硫脱氧胸苷的 DNA 的化学和物理性质

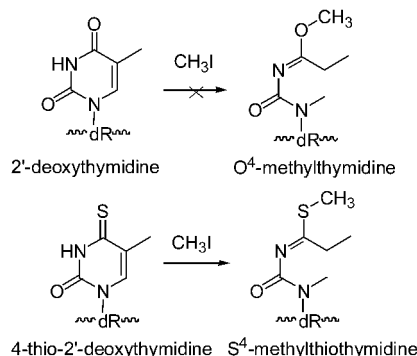
在很多方面 DNA 中硫碱基具有硫的性质,如较强的亲核性、易氧化和光化学行为,而不含硫原子的天然 DNA 不具有这些性质。这些硫碱基独特的性质已经在制备其他修饰碱基 DNA 中得到了应用,并可应用于生物学研究。

6.1 直接烷基化

制备含有烷基硫碱基的 DNA,常见的方法是制备一个烷基取代的烷硫碱基单体,然后合成该单体并最终生成含有烷基取代的硫碱基的 DNA 单体。这种方法可用于含有 S⁴-甲基胸腺嘧啶的 DNA 制备^[25]。

利用 DNA 中硫碱基独特的性质,我们设计出一个替换的方法即直接烷基化。通过用甲基碘化物(CH₃I)对 DNA 中硫胸腺嘧啶(碱基)直接烷基化来制备 S⁴-甲基硫脱氧胸苷及类似物。O⁴-甲基胸腺嘧啶是一个具有重要生物性能的修饰碱基,导致 DNA 复制中 GC 到 AT 的转化^[57]。S⁴-甲基硫胸腺嘧啶、O⁴-甲基胸腺嘧啶的结构类似(图式 6)。易产生 S⁴-甲基硫脱氧胸苷这一事实也暗示含硫脱氧胸苷的细胞可能有毒性,因此我们应该研究更多的含硫脱氧胸苷的细胞毒性。

硫脱氧胸苷(S⁴-dT)及类似物在硫甲基化后产生一个新的紫外吸收,其最大吸收在 315nm 左右^[57],而 4-硫-2'-脱氧胸苷的紫外最大吸收在 335nm^[14]。这些性质可用来研究 DNA 的 S⁴-dT 的硫甲基化(图 4)。使用 0.25% 甲基碘保温处理寡核苷酸序列 5-AATTTCCGGGATCCGTAXGCCTGCAGCCAAGCT-3(其中 X = S⁴T),这是典型的 S_N2 反应^[58]。经过不同时间后,样品可用快速蛋白质液相色谱(FPLC)分析,所得色谱表明可成功分离甲基化和未甲基化的寡核苷酸。图 4 显示含寡核苷酸的 S⁴T 在甲基化试剂的存在下进行快速转换。在 50min 后大约 50% 含底物的 S⁴T(S)被甲基化,在 140min 后,超过 80% 的含



图式 6 O⁴-甲基胸苷和 S⁴-甲基硫胸苷产物的合成和结构^[57]

Scheme 6 Synthesis & structures of O⁴-methylthymidine and S⁴-methylthiothymidine derivatives^[57]

底物的 S⁴T 已转换成甲基化产品(P)。

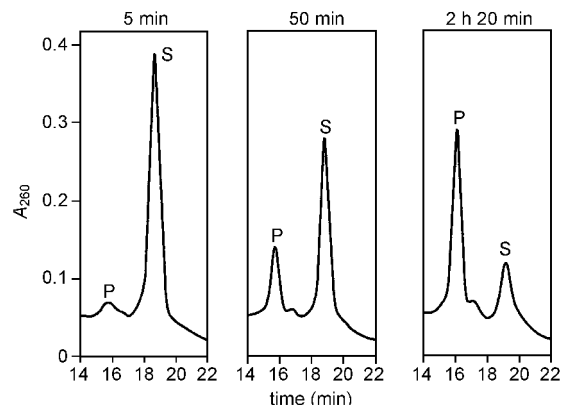


图 4 通过碘甲烷来甲基化 DNA 中的硫胸腺嘧啶(5-AATTTCCGGGATCCGTAXGCCTGCAGCCAAGCT-3 的寡核苷酸(X = 硫胸腺嘧啶)与 0.25% 的碘甲烷溶液反应,用 MonoQ HR 5/5 的色谱柱分离未甲基化和甲基化的产物。S:未甲基化寡核苷酸;P:甲基化产物)^[57]

Fig. 4 Methylation of S⁴-dT in DNA by methyl iodide: An oligodeoxynucleotide with the sequence 5-AATTTCCGGGATCCGTAXGCCTGCAGCCAAGCT-3, where X = S⁴-dT, was incubated with 0.25% MeI. Aliquots were withdrawn at the times indicated and the unmethylated and methylated forms were separated by chromatography on a MonoQ HR 5/5 column. The abscissa is the elution time from the column. S: unmodified substrate oligonucleotide; P: methylated product^[57]

6.2 光化学性质

DNA 是紫外(UV)光作用于生物体的主要靶分子。在低强度的 UV 光照射下,DNA 也会产生偶联产物^[59]。紫外光对 DNA 作用造成 DNA 损伤的主要光化学产物是环丁烷嘧啶二聚体(Pyr <> Pyr)

和(6-4)双嘧啶(嘧啶和嘧啶酮)光化学产物(图5),它们已被确定为有害的加合物,阻碍了DNA的复制与转录,从而造成细胞死亡,并可引起细胞变异^[60-63]。含硫碱基(如4-硫胸腺嘧啶)的核酸具有卓越的光化学性能,已用来详细研究光化学反应的形成机制和(6-4)加成的嘧啶产物和嘧啶酮14光反相产物^[64-68]。

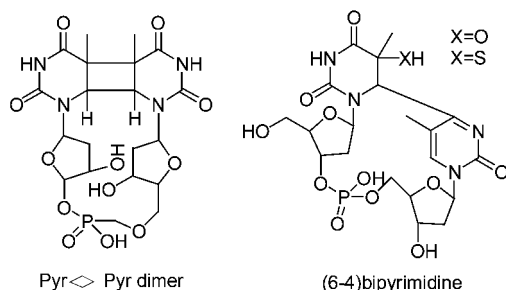
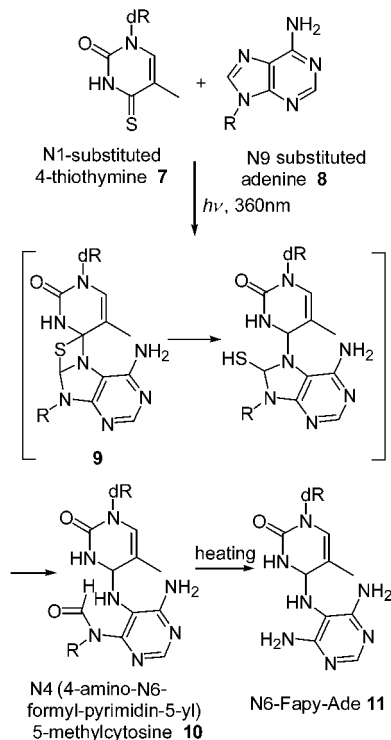


图5 环丁烷嘧啶二聚体和(6-4)双嘧啶(嘧啶和嘧啶酮)光化学产物的结构^[61-63]

Fig. 5 Structures of cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) bipyrimidine^[61-63]

在1—2当量的N9取代的腺苷存在时用光照射N1取代的4-硫胸腺嘧啶,不论取代基是什么(核糖,脱氧核糖体,羧甲基等),所得光化学反应产物令人意外,它提供一个单一光学产物,即N4(4-氨基-N6-甲酰嘧啶-5-基)5-甲基胞嘧啶(10)。有趣的是,在核苷系列中这种N6-甲酰胺基嘧啶腺苷可在碱性条件下衍生发生去甲酰化,当其失去最初连接在腺嘌呤核苷的N9,经加热分解得到化合物11(图式7)。这些光学加成物的形成,预计会再通过[2+2]环加成反应才出现N7-C8腺嘌呤核苷的双键^[69]。

光作用下的环加成反应,在不同波长的光照射下会得到不同的产物。由于这种类型的产物是由紫外线引起的DNA的加合物,它是一个重要光损害的产物,因此需对Tps⁴T进行光化学研究。Tps⁴T取得了4个光加成物(图式8)包括thietane 13与(6-4)双嘧啶(嘧啶和嘧啶酮)14,其比率是3:1,进一步光化学转换进入DNA的Dewar价异构体15。通过去氢,然后消除其硫(thiol)氢键,并以低产率形成一种新的光学化合物16。由于这个光化学反应生成的thietane 13将进一步反应生成(6-4)双嘧啶(嘧啶和嘧啶酮)14,为了停止在thietane 13阶段的光化学反应,4-硫胸腺嘧啶的N3位置由甲基所占据。另一个光作用下的环加成反应如图式9,从化合物17 Tpm³s⁴T出发,通过环加成反应得到化合物18,19



图式7 在N9取代腺嘌呤存在下光照射N1-取代4-硫胸腺嘧啶后产生的N6-甲酰胺基嘧啶腺苷^[69]

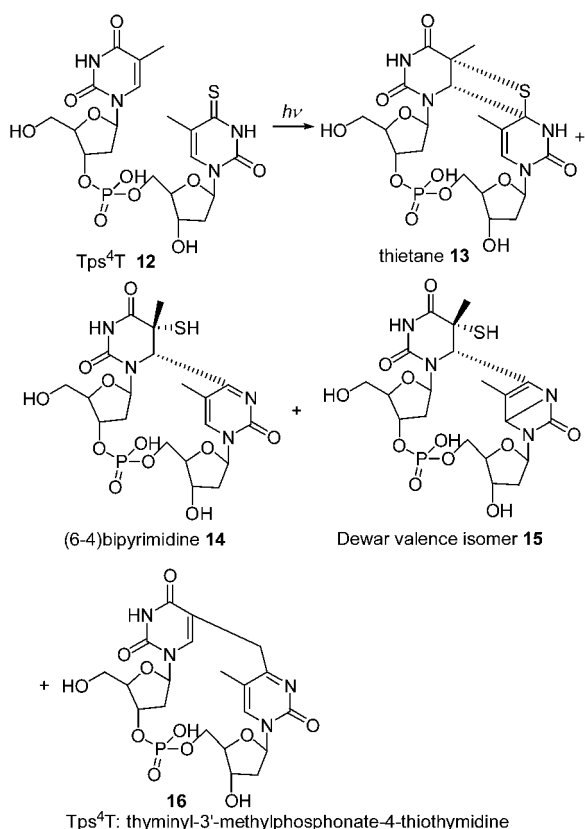
Scheme 7 Postulated reaction scheme yielding (N6-Fapy-Ade) upon irradiation of N1-substituted 4-thiothymine in the presence of N9 substituted adenine^[69]

和20,其产率分别是25%,2%和24%。最少的thietane 19形成这一环加成反应途径,其中5'-核苷是顺式的构象,而3'-核苷是反式的构象。可以通过稳定的thietane衍生物出现来检查其自身的光化学稳定性。

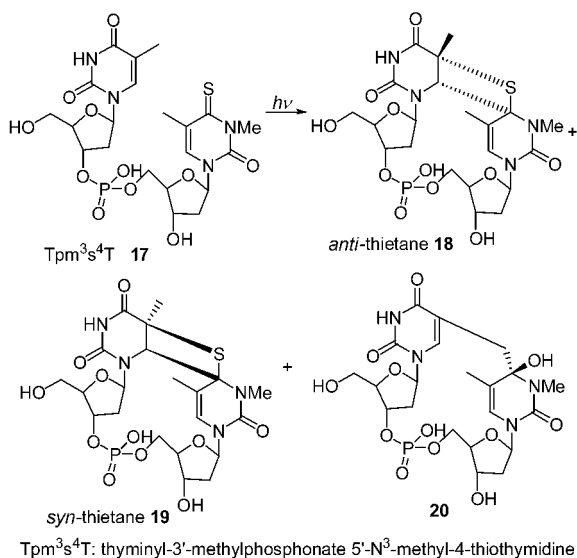
值得注意的是,含有互相交换的thietane 13和(6-4)双嘧啶(嘧啶和嘧啶酮)光学产物14的混合物,在波长为254nm的光照射下,其中性水溶液可以定量地恢复到Tps⁴T。但是,在pH=10的水溶液中,含有互相交换的13↔14的混合物,其结果是完全转变到14没有逆转反应发生,这表明光反转反应涉及thietane 13的254nm的光致活作用。这一点已得到证明,因为Tpm³s⁴T的254nm光反转作用,在pH值为6和pH值为10的反应体系下,thietane 18也可以得到^[68,69]。目前,详细分析在多聚核苷酸中S⁴T的光化学行为的报道很少,仅有文献报道当S⁴T进入八聚核苷酸中时,Tps⁴T双聚核苷酸的光化学行为可以再发生^[68]。

6.3 4-硫脱氧胸苷的紫外吸收及应用

正常条件下,天然碱基的紫外最大吸收峰在

图式 8 光照射 Tps⁴T 后获得的光化产物的结构^[68,70]

Scheme 8 Structure of the photoproducts obtained upon irradiation of Tps⁴T^[68,70]

图式 9 光照射 Tpm³s⁴T 后获得的光化产物的结构^[68,70]

Scheme 9 Structure of the photoproducts obtained upon irradiation of Tpm³s⁴T^[68,70]

260nm 左右,而那些含硫碱基的紫外线最大吸收峰一般在 340nm 左右。例如,4-硫脱氧胸苷在 335—

340nm 处有一吸收峰^[9]和 4-硫-5-溴-脱氧尿苷在 340—345nm 处有一吸收峰^[43]。这种特性也保留在含有硫碱基的 DNA 中,因此,对监测和辐射含有硫碱基的 DNA 是非常有用的^[71]。同时,可以利用这种性质来跟踪硫碱基的有关反应的路径^[72]。例如,胸腺嘧啶的 4-硫羰基经烷基化后在紫外光谱最大波长处会有较大的改变,因此紫外光谱可用于监测低聚体的结构变化。由于硫原子和氧原子结构很相近,胸腺嘧啶 4 位的氧和硫的替换不会引起结构的大改变,再加上具有独特的紫外吸收波长的性质,因此含硫碱基 DNA 已广泛地用于与蛋白质作用,例如生成光诱导及交联的底物^[73]。这种方法可以直接地证明其连接方式是交联键合。尽管交联结果并非很专一,交联结合也不很稳定,但是这个光交联作用方法已成功应用于核糖核酸拟酶的结构研究^[74]。

7 4-硫脱氧胸苷及类似物的 DNA 在癌症研究中的应用

我们已经描述了含硫碱基 DNA 的制备和将其转换成其他修饰 DNA 的化学,但它的生物应用更为重要。碱基修饰的 DNA 已经广泛应用于生物学研究中(评论见参考文献[4,5,29,36,52])。在癌症研究中使用硫碱基修饰的 DNA-紫外线辐射是一个崭新、拓展的课题,这里用几个例子说明其潜在的应用价值。

7.1 用紫外(UVA)作为一种新的癌症治疗手段

4-硫脱氧胸苷和低强度 UVA 光都不具有细胞毒性。用 4-硫脱氧胸苷处理过的细胞对低强度的 UVA 光非常敏感。4-硫脱氧胸苷与 UVA 光作用能够破坏 DNA 并杀死细胞^[22,57]。4-硫脱氧胸苷与 UVA 光的作用依赖硫代核苷和 DNA 与胸苷激酶(thymidine kinase, TK)的作用。癌细胞中胸苷激酶含量高时,对癌细胞中 DNA 的作用也强。脱氧胸苷和 4-硫脱氧胸苷不仅在结构上很相似,而且在碱基配对性质上也相近。所以 4-硫脱氧胸苷和脱氧胸苷一样,也能专一地与腺嘌呤配对^[22],并且 4-硫脱氧胸苷在 335 nm 处有最大吸收,对 UVA 光敏感。我们现在正进一步利用这种方法进行癌症治疗的研究。

7.2 4-硫-5-溴-脱氧尿苷作为药物前体在癌症研究中的应用

最近我们发现 4-硫-5-溴脱氧尿苷(2'-deoxy-4-thio-5-bromouridine, S⁴-BrdU)^[43]在 340 nm 处有最大吸收,对 UVA 光也敏感(图 1)。尽管作用方式看

上去与 4-硫脱氧胸苷有所不同,但它也使细胞对 UVA 光敏感。由于 5 位不同的取代基会产生不同的共轭效应,共轭的加强导致核苷紫外吸收的波长较长,研究发现其远远超过正常 DNA 的核苷吸收范围(260—270nm)。由于 4-硫-5-溴脱氧尿苷的最大波长接近可见光,紫外线激活的 4-硫-5-溴脱氧尿苷对正常 DNA 造成的损害很小,提高了杀死细胞的选择性。5-溴-脱氧尿苷(5-bromouridine, BrdU)也很容易进入细胞中的 DNA,其对紫外线的敏感性依赖于光敏剂(如 Hoechst 染料)^[75]。在 5-溴脱氧尿苷和 Hoechst 染料并存时,细胞对 UVA 光的影响更为敏感^[76]。这是因为,在两者并存的条件下,染料能吸收紫外线的光子,并提供给溴原子分化变异的能量^[76],从而促进 DNA 链断裂。4-硫-5-溴脱氧尿苷本身可以充当生色团,因而避免对染料的需求。此外,5-溴-脱氧尿苷的溴可以脱离其激发态本身,导致 DNA 链断裂。因此 4-硫-5-溴脱氧尿苷/UVA 治疗是使细胞死亡的另一途径。这表明在 UVA 光辅助下含硫胸腺嘧啶类似物可作为抗癌药物,这样新型抗癌技术的研究成果为进一步研究肿瘤的综合治疗提供了方向和思路。

8 结论和展望

以上主要讨论了 4-硫脱氧胸苷及类似物在紫外光(UVA)作用下作为一种抗癌药物在癌症治疗中的应用,以及相关的 DNA 化学。4-硫脱氧胸苷及类似物在紫外光(UVA)作用下作为治疗癌症药物具有下列优点。

(1) 无毒:对紫外光(UVA)敏感的化学物质(S^4 -dT 和 S^4 -BrdU)不暴露在 UVA 光下时对细胞是无毒害的,而化疗中使用的药物几乎都具有很高的细胞毒性。

(2) 较低能量:紫外光(UVA 吸收带 315—400nm)波长远大于放疗中所用的 X 射线(约 1nm)和 γ 射线(0.01nm)波长。UVA 的低能量使其杀死细胞的条件比较温和并具有潜在的选择性,对人体细胞无伤害。

(3) 选择性作用于癌细胞:这些药物(S^4 -dT 和 S^4 -BrdU)对细胞的协同作用依赖胸苷激酶(TK),它可以调控癌细胞和肿瘤细胞等的增生,选择性地作用于癌细胞,而光动力学治疗(PDT)中使用的光敏试剂并不聚集在细胞核,因此不能选择性作用于癌细胞。

正是由于 UVA 光作用下的 4-硫脱氧胸苷及类

似物有上述独特的优点,所以对此类化合物的开发研究具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Lindahl T. *Nature*, 1993, 362: 709—715
- [2] Lindahl T, Wood R D. *Science*, 1999, 286: 897—1905
- [3] Dougherty T J, Gomer C J, Henderson B W, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998, 90: 889—905
- [4] Qiao L. *Chinese Medicine of Factory and Mine*, 2009, 11(2): 22—25
- [5] 许德余(Xu D Y). *中国医药工业杂志(Chinese Journal of Pharmaceuticals)*, 1987, 18: 311—313
- [6] De Clercq E. *Med. Res. Rev.*, 2002, 22: 531—565
- [7] Perigaud C, Gosselin G, Imbach J L. *Nucleosides & Nucleotides*, 1992, 11: 903—908 (more references therein)
- [8] Xu Y Z, Zheng Q, Swann P F. *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32: 2817—2820
- [9] Coleman R S, Kesicki E A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116: 11636—11642
- [10] Kulikowski T, Shugar D. *J. Med. Chem.*, 1974, 17: 269—274
- [11] Peyrane F, Fourrey J L, Clivio P. *Chem. Commun.*, 2003, 736—737
- [12] Bretner M, Felczak K, Dzik J M, Golos B, Rode W, Drabikowska A, Poznanski J, Krawiec K, Piasek A, Shugar D, Kulikowski T. *Nucleosides & Nucleotides*, 1997, 16: 1295—1299
- [13] Lipsett M N. *Journal of Biol. Chem.*, 1965, 240: 3975—3980
- [14] Xu Y Z, Zheng Q, Swann P F. *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 929—932
- [15] Xu Y Z. *Prog. Nat. Sci.*, 2002, 10: 401—413
- [16] Xu Y Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8: 1839—1844
- [17] Favre A. in *Bioorganic Photochemistry: Photochemistry and the Nucleic Acids* (Ed. Morrison H). New York: Wiley, 1990. 379—425
- [18] Favre A, Saitomé C, Fourrey J L, Clivio P, Laugaa P. *Photochem. Photobiol. B*, 1998, 42: 109—124
- [19] Milder S J, Kliger D S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107: 7365—7373
- [20] Xu Y Z. in *Modified Nucleosides, Synthesis and Applications*, (Ed. Loakes D). Kerala: Research Signpost, 2002. 1—16
- [21] Warren M A, Murray J B, Connolly B A. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 279: 89—100
- [22] Massey A, Xu Y Z, Karran P. *Current Biology*, 2001, 11: 1142—1146
- [23] O'Donovan P, Perrett C M, Zhang X H, Montaner B, Xu Y Z, Harwood C A, McGregor J M, Walker S L, Hanaoka F, Karran P. *Science*, 2005, 309: 1871—1874
- [24] Reelfs O, Xu Y Z, Massey A, Karran P, Storey A. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007, 6(9): 2487—2495
- [25] Connolly B, Newman P C. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(13): 4957—4974

- [26] Okamoto I, Shohda K, Selo K, Sekine M. *Nucleic Acid Research*, 2003, 3: 147—148
- [27] Gait M J (Ed.). *Oligonucleotides Synthesis: A Practical Approach*. Oxford: IRL, 1984
- [28] Connolly B A. *Methods in Enzymology*, 1992, 211: 36—58
- [29] Singer B, Hang B. *Chemical Research Toxicology*, 1997, 10 (7): 713—732
- [30] Xu Y Z, Swann P F. *Nucleosides & Nucleotides*, 1991, 10 (1/3): 315—318
- [31] Xu Y Z, Zheng Q, Swann P F. *Tetrahedron*, 1992, 48 (9): 1729—1740
- [32] Xu Y Z, Zheng Q, Swann P F. *Tetrahedron Letter*, 1992, 33 (39): 5837—5840
- [33] Xu Y Z, Zheng Q, Swann P F. *Journal of Organic Chemistry*, 1992, 57(14): 3839—3845
- [34] Macmillan A M, Verdine G L. *Journal of Organic Chemistry*, 1990, 55(24): 5931—5933
- [35] Macmillan A M, Verdine G L. *Tetrahedron*, 1991, 47(14/15): 2603—2607
- [36] Verma S, Eckstein F. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67: 99—134
- [37] Krokan H E, Standal R, Slupphang C. *Biochemistry Journal*, 1997, 325: 1—17
- [38] Ramesh V, Xu Y Z, Roberts G C. *FEBS Letters*, 1995, 363(1/2): 61—64
- [39] Xu Y Z, Ramesh V, Swann P F. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1996, 6(10): 1179—1182
- [40] Vorbruggen H, Bennua B. *Tetrahedron Letter*, 1978, 15: 1139—1142
- [41] Connolly B A, Nowman P C. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17 (13): 4957—4974
- [42] Xu Y Z, Zheng Q G, Swann P F. *Tetrahedron Letter*, 1991, 32 (24): 2817—2820
- [43] Xu Y Z, Zhang X H, Wu H C, Massey A, Karren P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14: 95—97
- [44] Zhang X H, Guo M, Wang A L, Xu Y Z. 中国化学会第六届有机化学学术会议 (CCS 6th Nation Organic Chemistry Conference). 西安 (Xi'an), 2009. part 2: 361
- [45] Xu Y Z, Zheng Q, Swann P F. *Journal of Organic Chemistry*, 1992, 57(14): 3839—3845
- [46] Webb T R, Matteucci M D. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14 (19): 7661—7674
- [47] Nikiforov T T, Connolly B A. *Tetrahedron Letter*, 1992, 33 (17): 2379—2382
- [48] Clivio P, Fourrey J L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1996, 2203—2204
- [49] Liu J, Taylor J S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 3287—3288
- [50] King P P, Jones R A. *Tetrahedron Letter*, 1991, 32 (32): 3919—3922
- [51] Rees C B, Skone P A. *Journal of the Chemistry Society Perkin Transactions I*, 1984, 6: 1263—1267
- [52] Shah X, Wu H Y, Rans T M. *Bioconjugate Chemistry*, 1994, 5 (6): 508—512
- [53] Nikiforov T T, Connolly B A. *Tetrahedron Letter*, 1991, 32 (31): 3851—3853
- [54] Coleman R S, Siedlecki J M. *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114(23): 9229—9230
- [55] Coleman R S, Kesicki E A. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116(26): 11636—11642
- [56] Xu Y Z, Swann P F. *Analytical Chemistry*, 1992, 204 (1): 185—189
- [57] Massey A, Xu Y Z, Karren P. *DNA Repair*, 2002, 1: 275—286
- [58] Rydberg B, Lindahl L T. *EMBO J.*, 1982, 1: 211—216
- [59] Favre A, Saintomé C, Fourrey J L, Clivio P, Laugga P. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1998, 42: 109—124
- [60] Taylor J S. *Pure Appl. Chem.*, 1995, 67: 183—190
- [61] Davies R J H. *Biochem. Soc. Trans.*, 1995, 23: 405—418
- [62] Carell T. *Chimia*, 1995, 49: 365—373
- [63] Friedberg E C, Walker G C, Siede W. *DNA Repair and Mutagenesis*, Washington, DC: ASM Press, 1995
- [64] Fourrey J L, Gasche J, Fontaine C, Guitter E, Favre A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1989, 1334—1336
- [65] Clivio P, Fourrey J L, Gasche J, Favre A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113: 5481—5483
- [66] Clivio P, Fourrey J L, Gasche J, Favre A. *Tetrahedron Lett.*, 1992, 33: 1615—1618
- [67] Clivio P, Fourrey J L, Szabo T, Stawinski J. *J. Org. Chem.*, 1994, 59: 7273—7283
- [68] Liu J, Taylor J S. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 3287—3288
- [69] Clivio P, Fourrey J L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1996, 2203—2204
- [70] Saintome C, Clivio P, Favre A, Fourrey J L, Riche C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 8142—8143
- [71] Meisenheimer K M, Koch T H. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 32(2): 101—140
- [72] Nikiforov T T, Connolly B A. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20 (6): 1209—1214
- [73] Cahill M A, Nordheim A, Xu Y Z. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 229(1): 170—175
- [74] Favre A, Fourrey J L. *Accounts of Chemical Research*, 1995, 28 (9): 375—382
- [75] Rosenstein B S, Setlow R B, Ahmed F E. *Photochem. Photobiol.*, 1980, 31: 215—221
- [76] Limoli C L, Ward J F. *Radiat. Res.*, 1994, 138: 312—316